



KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr
Certification of patent application no

1999 6339

► Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.12.23

► *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.12.23*

2003.07.17

Freddy Strømmen

Freddy Strømmen
Seksjonsleder

Line Reum

Line Reum



PATENTSTYRET®

Styret for det industrielle rettsvern

16

PATENTSTYRET

20.DES.99 996339

20 DES. 1999

EK/KBN

17.12.99

E10516

UTSKILT FRA SØKNAD nr. 19986133 av 23/12-1998

Preben Lexow
Fløensbakken 41A
5009 Bergen

Oppfinner:

Søkeren

Metoder for sekvensanalyse

Foreliggende oppfinnelse er utskilt fra patentsøknad 19986133 som omfatter en metode for DNA-sekvensering som inneholder følgende trinn:

Første trinn tar utgangspunkt i en ren DNA-populasjon bestående av DNA-sekvensen som skal sekvenseres. DNA-molekylene kuttes/brekkes på en uspesifikk måte slik at det dannes en populasjon med DNA-molekyler bestående av biter (heretter kalt DNA-biter) av den opprinnelige sekvensen.

Annet trinn består i å erstatte baseparene i DNA-bitene med 4 ulike DNA-sekvenser (heretter kalt DNA-fragmenter) som representerer hver av de fire basene adenin, cytosin, guanin og tymin. Der hvor det har vært basepar A-T, settes det altså inn "fragment A", C-G byttes ut med "fragment C" osv. Dermed genereres nye DNA-molekyler hvor den opprinnelige baserekkefølgen på f.eks. ACGTT... erstattes med fragment A - fragment C - fragment G osv. Lengden på disse fire DNA-fragmentene kan i prinsippet variere i lengde fra 2bp til flere hundre kbp (eller mer om ønskelig), alt etter behov. Tilsvarende kan DNA-fragmentene inneholde reportergener og annen biologisk informasjon eller kun bestå av sekvenser uten kjent biologisk funksjon.

I tredje trinn avleses rekkefølgen av de fire typene DNA-fragmenter for hvert enkelt DNA-molekyl. Dermed finner man baserekkefølgen i de opprinnelige DNA-bitene indirekte.

I fjerde trinn benytter et dataprogram overlappen mellom DNA-bitene til å sette sammen informasjonen fra trinn 3 til sekvensen på DNA-sekvensene som ble brukt som utgangspunkt.

Foreliggende oppfinnelse omhandler DNA-profiler og metoder for sekvensanalyse.

DNA profiler

Prinsippene som er introdusert i patentsoknaden kan brukes til å sette sammen en rekke ulike protokoller for å analysere ulike DNA profiler. F.eks. ekspresjonen av mRNA i en celle;

- 1) mRNA molekylene konverteres til cDNA.
- 2) cDNA molekylene kuttes med et klasse IIIS restriksjonsenzym.
- 3) Overhengene ligeres med konverterings adapttere.
- 4) DNA molekylene rettes ut, merkes og avleses med egnet utstyr.

Hvert mRNA molekyl vil gi opphav til et unikt mønster basert på hvor det er lokalisert kutteseter, sammensetningen av overhengene som dannes og deres innbyrdes avstander. Dermed blir det mulig å skille mellom flere tusen ulike mRNA molekyler. Et viktig poeng er at de kvantitative analysene blir svært nøyaktige fordi man analyserer enkeltmolekyler direkte. Dermed unngår man måleusikkerheten som oppstår pga oppamplifisering, varierende signalintensiteter, osv.

Det er viktig å understreke at dette er bare et av mange eksempler på hvordan prinsippene i patentsoknaden kan brukes til å undersøke DNA profiler. Videre må det nevnes at metodene ikke er begrenset til måling av mRNA ekspresjon. F.eks. er det mulig å analysere sammensetningen av mikrober i en mikroflora, identifisere personer (fingerprinting), osv.

Konverteringsmetode basert på hårnålsadapttere

Et sentralt poeng i flere av konverteringsalternativene beskrevet tidligere (f.eks. alternativ 1, 2 og 3) er at man etter å ha konvertert basepar «oversører» DNA fragmentene til den andre enden av DNA molekylet som konverteres. Dermed frigjør man enden som konverteres slik at man kan gå videre til neste syklus, samtidig som man tar vare på DNA fragmentene. Nedenfor følger en annen strategi for å overføre DNA fragmenter til DNA bitens andre ende. Strategien gjør at man unngår enkelte av svakhetene til de tidligere beskrivne konverteringsalternativene (feilkonverteringer pga intermolekylære ligeringer, behov for flere tidkrevende ligeringstrinn per syklus, mm).

Utgangspunktet er at mange ligaser, inkludert T4 DNA ligase, kan ligere overheng på dsDNA med endene på ssDNA. Det kan bl.a. utnyttes på følgende måte:

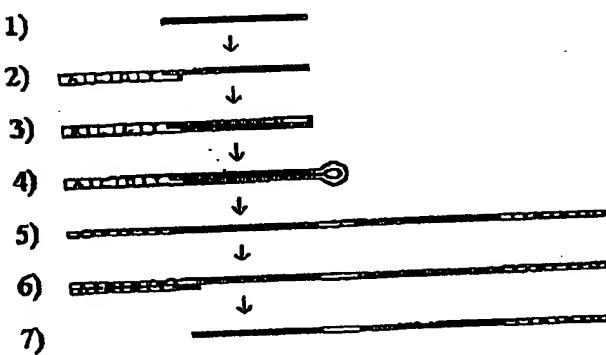


Fig1 konvertering vha hårnålsadapttere. 1) Konverteringen innledes med at bitene med mål DNA gjøres enkeltrådig (strengt tatt ikke nødvendig). 2) Konverteringsadapttere tilsettes og ligeres med 3' enden på DNA

bitene. 3) Polymeraseekstensjon 4) HårmålsadAPTERE tilsettes og ligeres. Enden på konverteringsadAPTEREN er på forhånd behandlet slik at den ikke ligeres med hårmålsadAPTEREN (f.eks. fosfatasebehandlet). 5) DNA molekylene smeltes. 6) De enkeltrådige DNA molekylene hybridiseres med DNA molekyler som komplementerer fragmentene. De komplementære DNA molekylene har i tillegg et overheng med universelle baser som hybridiseres med de første basene i mål DNA'en. 7) Ved hjelp av et kutesete for et enzym som lager overheng utenfor sin egen gjennomsekvens klargjøres mål DNA'en for neste konverteringssyklus.

Konverteringsmetode basert på sammenlinking av konverte DNA molekyler

Mange av de tidligere beskrevne konverteringsmetodene er basert på at konverteringen gjøres i en sykisk prosess. Antallet konverte basepar per signalkjede vokser dermed lineært med antallet sykluser. En alternativ strategi er å koble konverte DNA biter sammen i lange kjeder. Svært mange metoder kan tenkes basert på dette prinsippet og nedenfor følger et forslag:

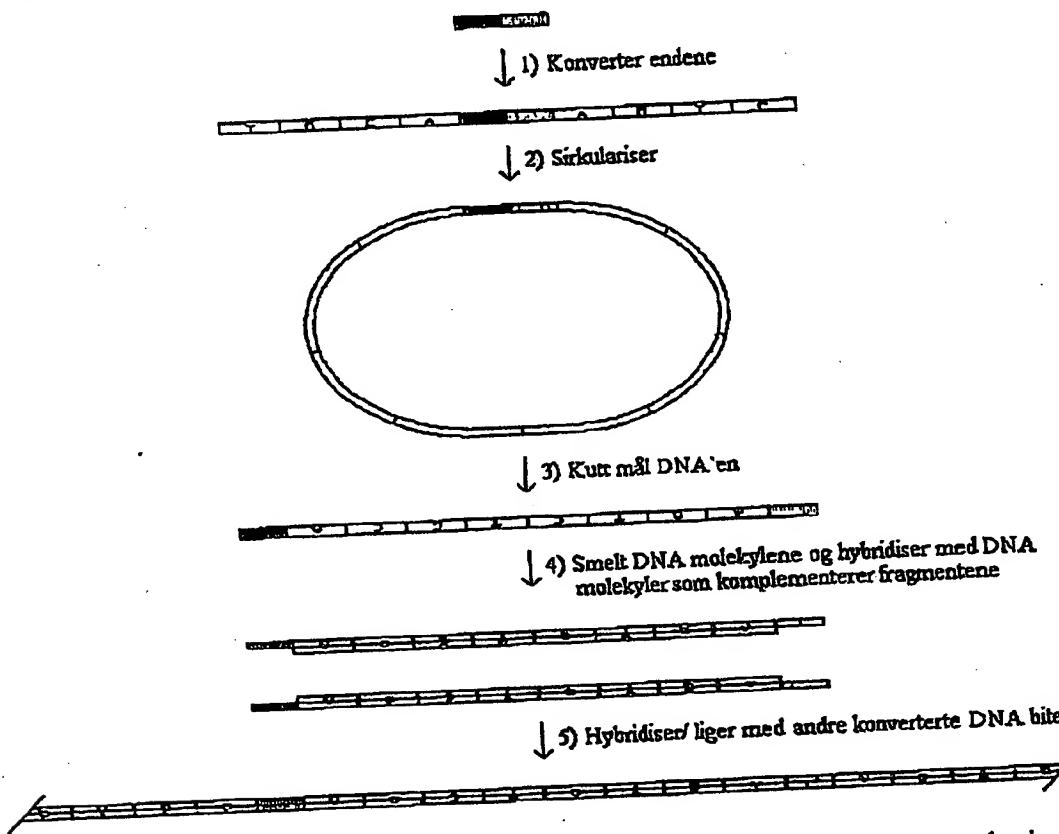


Fig 2 Konverteringsstrategi basert på sammenkobling av konverte DNA biter. Metoden innledes med at mål DNA'en kuttes opp og sorteres etter størrelse. DNA biter med en bestemt lengde, f.eks. 30 bp plukkes deretter ut til prosedyren. 1) DNA biteres ender konverteres med tidligere beskrevne teknikker 2) Det konverte DNA molekylet sirkulariseres. 3) Det tilsettes et IIS enzym som bruker et kutesete lokalisert på konverteringsadAPTERENS ende. Dermed kuttes DNA biten slik som illustrert. 4) DNA molekylene smeltes og hybridiseres med DNA molekyler som komplementerer fragmentene, f.eks. fluorescensmerkede prober. 5) Til slutt hybridiseres og evt ligeres de konverte DNA biterne i løsningen.

Siden overhengene med mål DNA i det ovennevnte eksempelet søker komplementære overheng, vil hver konverte DNA bit hybridiseres/ ligeres med tilstøtende DNA biter. Dermed dannes en signalkjede som gir informasjon om sekvensbiter på 8bp avbrutt av 22

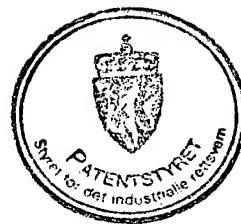
ukjente (f.eks. ...AGCTGTGA N₂₂AGTCTGCA N₂₂TGAC...). Antallet ukjente basepar er bestemt av lengden på DNA biten initialt minus antallet basepar konvertert per DNA bit. Basert på overlapp mellom signalkjeder kan man dermed rekonstruere målsekvensen selv i områder med repetitive sekvenser.



P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for sekvensanalyse, karakterisert ved beskrivelsen.



1e

20 DES. 1999

PATENTSTYRET
20.DES.99 996339

Sammendrag

O. nr. E10516

Fremgangsmåte for sekvensanalyse.

